

## ESTUDIOS ULTRAMICROSCOPICOS DE *Streptococcus canis* y *Streptococcus dysgalactiae* AISLADOS DE VAGINAS CANINAS

A.E. Guerrero<sup>ac</sup>, S.B. Jurado<sup>b</sup>, G. Giacoboni<sup>c</sup>, M.C. Stornelli<sup>a</sup>, G.H. Sguazza<sup>d</sup>, M.A. Stornelli<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

<sup>b</sup> Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

<sup>c</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

<sup>d</sup> Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

\*Autor de correspondencia: Calle 60y 118, La Plata, Argentina; email: astornel@fcv.unlp.edu.ar; Tel. +54-2214236663/4, Interno 455; fax +54-2214257980.

Recibido: Febrero 2017. Aprobado: Octubre 2017.

Publicado: Diciembre 2017.

### RESUMEN

Estreptococos  $\beta$  hemolíticos se han aislado de vaginas caninas y de neonatos con septicemia. Se realizaron estudios ultraestructurales de 15 cepas de *S. canis* y 7 cepas de *S. dysgalactiae* aisladas de la vagina de 22 perras de las 23 utilizadas en este trabajo. Las 23 perras, clínicamente sanas, fueron divididas en dos grupos: las del primer grupo (G1; n=7) fueron perras que no poseían antecedentes de muertes neonatales y las del segundo grupo (G2; n=16) fueron perras que poseían antecedentes de muertes neonatales. Los datos obtenidos del estudio ultraestructural fueron analizados mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> 6.12 ( $p < 0,05$ ; SAS, 2003). El estudio ultramicroscópico realizado mediante tinción negativa de los primoaislamientos permitió observar estructuras compatibles con cápsula en 21 de los 22 aislamientos de *S. canis* y *S. dysgalactiae*. Todos los cortes ultrafinos de los estreptococos aislados mostraron presencia de estructuras compatibles con la proteína M. Las medidas de las cápsulas de las cepas de *S. canis* y *S. dysgalactiae* fueron similares ( $218,95 \pm 21,56$  vs.  $210,71 \pm 10,39$  nm.). Las cepas de *S. canis* provenientes de perras G2 mostraron cápsulas más gruesas que las del grupo G1 ( $234 \pm 24,2$  vs.  $151,23 \pm 28,93$  nm;  $p < 0,001$ ). Las cepas de *S. dysgalactiae* mostraron cápsulas similares ( $210 \pm 13,54$  vs.  $211,66 \pm 19,67$  nm). La cápsula más gruesa observada en las cepas de *S. canis* podría indicar que la cápsula es un factor de virulencia implicado en la producción de enfermedad neonatal.

**Palabras clave:** Estreptococos  $\beta$  hemolíticos, canino, neonato.

### ULTRAMICROSCOPIC STUDIES OF *Streptococcus canis* and *Streptococcus dysgalactiae* ISOLATED FROM CANINE VAGINAS

#### ABSTRACT

$\beta$ -hemolytic streptococci have been isolated from vaginas of bitches and puppies with neonatal septicemia. Ultramicroscopic study were done in 15 strains of *S. canis* and 7 strains of *S. dysgalactiae* isolated from vagina of bitches, aged between two and six years old and clinically healthy, divided in two groups. Group one (G1) bitches that have delivered healthy litters, group two (G2) bitches that have delivered puppies who died in the neonatal period. Direct observation in fresh using negative staining and observation of ultrathin sections were done. Data were analyzed by variance analysis of SAS<sup>®</sup>. Ultramicroscopic study showed structures like capsules in direct observation and structures like M protein in ultrathin sections. Capsules were observed in 21 of 22 isolation of *S. canis* and *S. dysgalactiae* studied. All ultrathin sections showed M protein. The capsule size of *S. canis* and *S. dysgalactiae* studied were similar. Capsule of *S. canis* isolated from G2 bitches were higher than capsules of strains isolated from G1 bitches ( $234 \pm 24,2$  vs.  $151,23 \pm 28,93$  nm;  $p < 0,001$ ). *S. dysgalactiae* strains showed similar measures. Thicker capsules observed in *S. canis* could be related with the bacteria pathogenicity and the neonatal disease.

**Keywords:**  $\beta$ -hemolytic streptococci, canine, newborn.

## INTRODUCCIÓN

Los *Streptococcus* spp son patógenos oportunistas en mamíferos y pueden asociarse a variadas enfermedades que afectan a múltiples órganos y sistemas [1]. Se han aislado estreptococos  $\beta$  hemolíticos de vagina de perras en diferentes estadios del ciclo estral [2, 3]. Así mismo estos microorganismos han sido encontrados en neonatos muertos. Se han aislado *Streptococcus canis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus equi* de cachorros recién nacidos con septicemia [4, 5].

Diferentes factores de virulencia han sido identificados en el género estreptococo. Los factores de virulencia de *S. dysgalactiae* se basan en la evasión de la respuesta inmune a través de proteínas secretadas y estructuras de la superficie de la pared que impiden la fagocitosis. Las proteínas estreptocócicas incluyen la proteína M, la estreptoquinasa, exotoxina pirogénica C (speC), estreptolisina O o S, estreptodornasa (DNasa), exotoxina pirogénica G y hialuronidasa [6]. La cápsula ha sido observada y asociada a la virulencia de *S. dysgalactiae* [7].

Dentro de los factores de virulencia de *S. canis* está la proteína M, la estreptolisina O (SLO) y el factor CAMP. La proteína M posibilita la ocurrencia de septicemia neonatal en gatos y fascitis necrotizante en perros [6, 8]. No se ha mencionado la presencia de cápsula dentro de los factores de virulencia de *S. canis*. [6].

La cápsula ha sido un factor de virulencia observado en *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. suis* y *S. pneumoniae*. La cápsula de polisacárido de *S. pneumoniae* es uno de los factores de virulencia responsable de la acción patógena de este microorganismo [9]. La cápsula de *S. pyogenes* sirve como una adhesina, así como un factor anti-fagocítico que se une a queratinocitos de la mucosa faríngea y la piel, principales sitios de entrada del patógeno [10].

Según nuestro conocimiento no existen descripciones de cápsula en *S. canis*, sin embargo su presencia podría ser un factor de virulencia importante en la patogenia de la enfermedad causante de muerte en neonatos caninos. El hallazgo de este microorganismo en la microbiota vaginal de la perra gestante y su aislamiento de neonatos con septicemia sustentan la hipótesis planteada.

El objetivo del trabajo fue estudiar la presencia o no de cápsula y proteína M en cepas de *S. canis* y *S. dysgalactiae* aislados de vaginas de perras que habían parido una o más camadas normales o camadas con muertes neonatales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 15 cepas de *S. canis* y 7 cepas de *S. dysgalactiae* aisladas de la vagina de 21 perras, de diferentes razas (Dogo Argentino, Dogo de Burdeos, Gran Danés, Ovejero Alemán, Schnawzer miniatura, Boyero de Berna, Labrador, Bulldog Inglés y Francés), de entre dos y seis años de edad, clínicamente sanas, y con un peso entre 7 y 40 kg. Las hembras fueron divididas en dos grupos. Las perras asignadas al primer grupo (G1= 7) fueron perras que no poseían antecedentes de muertes neonatales y las perras del segundo grupo (G2=15) fueron perras que poseían antecedentes de muertes neonatales. A partir del proestro, de cada hembra se tomó una muestra para realizar estudios citológicos vaginales día por medio. Se registró el primer día del diestro citológico [11]. Entre 45 y 48 días más tarde se tomó una muestra para el cultivo bacteriano del fondo de vagina de las hembras gestantes mediante hisopo cubierto [12]. Los hisopos obtenidos fueron colocados en medio de transporte de Stuart y remitidos al laboratorio para su procesamiento dentro de las 24 horas de su extracción.

Los estreptococos obtenidos del fondo de vagina fueron identificados por métodos fenotípicos, serológicos y genotípicos (PCR). La identificación bacteriana

fenotípica fue realizada utilizando los métodos de identificación estándar [13, 14]. Se realizó el estudio macroscópico de las colonias observándose la forma, tamaño y aspecto, así como la producción de hemólisis. Posteriormente se realizó la coloración de Gram y la observación al microscópico óptico de la bacteria. Los cocos Gram positivos se repicaron en agar sangre para obtener un cultivo puro, a partir del cual se les realizó la prueba de la catalasa para diferenciarlos del género *Staphylococcus*. A los cocos catalasa negativos se les realizó la prueba pirrolidonil-beta-naftilamida (PYR; Britania S.A., CABA, Argentina), para diferenciar los géneros *Streptococcus* de los *Enterococcus*. Para la identificación fenotípica de las especies de estreptococos, se utilizó la siguiente batería de pruebas bioquímicas y fisiológicas: fermentación de lactosa, maltosa, celobiosa, sorbitol, arabinosa, manitol y trehalosa, hidrólisis de la esculina y arginina, prueba de Voges Proskauer (VP) y determinación del factor CAMP [14].

La serología se realizó de acuerdo a la clasificación de Lancefield [15]. El grupo Lancefield A, B, C, D, F, y G se determinó a partir de cultivos frescos por una prueba de aglutinación de látex (kit Agrupación estreptocócica. Streptex, Clipper Boulevard West, Crossways Dartford, Kent, DA2 6PT UK; [16]. A las cepas identificadas por pruebas bioquímicas y serológicas como *S. canis* se les realizó la prueba de PCR utilizando los cebadores correspondientes para identificar el gen *cfr* que codifica para el factor CAMP específico de *S. canis*: Camp-I: 5'-CAA TTA ACT AAT AAG GTA GAA CAG-3' y camp-II 5'-CTC TCT CAA AAC GGG TG-3' [17]. Se utilizó como control positivo una cepa de *S. canis* (ATCC ® 43497 <sup>TM</sup>) y un control negativo. A las cepas identificadas por pruebas bioquímicas y serológicas como *S. dysgalactiae* se les realizó la prueba de PCR utilizando los cebadores específicos dyCF 5'-AAG GAA ATG GAA CAC GTT AGG G-3' y adyR 5'-TCC TAC

CAT GAC ACT AAT GTG TC-3 (Biodynamics. CABA, Argentina). Estos cebadores son comunes a las dos subespecies de *S. dysgalactiae* (identificación del gen 23 S de ADN<sub>r</sub>; [18]. Se utilizó como control positivo una cepa de *S. dysgalactiae* (ATCC ® 43078 <sup>TM</sup>) y un control negativo.

### Microscopía electrónica

Se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (MET) para estudiar la presencia o ausencia de proteína M y cápsula de las 15 cepas de *S. canis* y de las 7 cepas de *S. dysgalactiae* aisladas. Para estudiar la proteína M, las células bacterianas de 17 cepas se incluyeron en bloques de resina epoxi para la obtención de cortes ultrafinos. En cambio, para la observación de la cápsula se utilizó la técnica de tinción negativa sobre células bacterianas enteras obtenidas de los 22 primoaislamientos.

#### a. Cortes ultrafinos:

Por cada cepa se realizó una suspensión en solución fisiológica estéril de las colonias en tubos Eppendorf. A continuación, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y los pellets obtenidos se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) con el agregado de 0,5% de alcian blue durante 2 horas a 4°C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C y a continuación, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se obtuvieron en un ultramicrotomo Leica EM UC7, luego se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con el MET JEM 1200 EX II. En cinco de los 22 aislamientos no se recuperaron suficientes colonias para hacer una suspensión que permitiera obtener un pellet apto para realizar cortes ultrafinos.

#### b. Tinción negativa:

Por cada cepa se realizó una suspensión en solución fisiológica estéril de las colonias. De cada suspensión se obtuvo una gota que se colocó sobre una grilla de cobre (400 mesh) cubierta por colodion durante 5 minutos. A continuación, se eliminó el excedente apoyando la grilla sobre un papel de filtro. Las bacterias adheridas a la grilla fueron contrastadas con ácido fosfotúngstico al 2% durante 40 segundos. Inmediatamente las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

#### Análisis estadístico

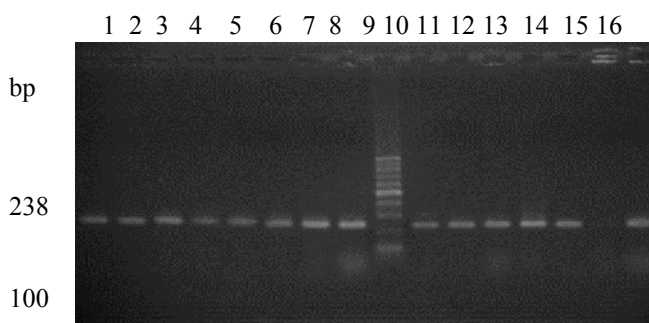
Las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos para variables cuantitativas fueron realizadas utilizando el Análisis de Varianza con el procedimiento GLM de SAS® [19]. Los parámetros morfométricos fueron expresados como la media  $\pm$  E.S. La significancia fue definida como  $P < 0,05$ .

#### Marco bioético del uso de animales

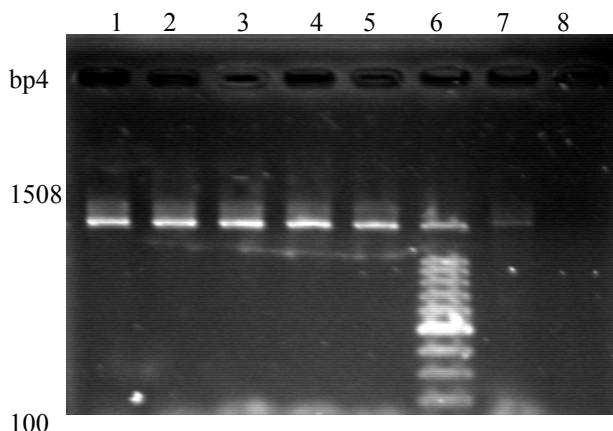
Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y utilizando las recomendaciones de la Academia de Ciencias de EEUU referidas al uso de caninos como animales de laboratorio [20]. Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras de sangre y procedimientos experimentales [20]. Además contó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV-UNLP (14-10-12).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas del G1 y del G2 que se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas con el grupo G de Lancefield (*S. canis*), se confirmaron por la prueba de PCR y produjeron amplicones con los tamaños esperados que permitieron su detección, con productos de 238 bp (Fig 1). Las del G1 y del G2 que se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas con el grupo C de Lancefield (*S. dysgalactiae*), dieron productos de 1508 bp compatibles con los de *S. dysgalactiae* (Fig. 2).



**Fig. 1.** Amplicones de *S. canis*. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14: Cepas de *S. canis*. 9: Marcador de peso molecular. 15: Control negativo. 16: Control positivo (ATCC® 43497™).



**Fig. 2.** Amplicones de *S. dysgalactiae*. 1, 2, 3, 4, 5: Cepas de *S. dysgalactiae*. 6: Marcador de peso molecular. 7: Control positivo (ATCC® 43078™). 8: Control negativo.

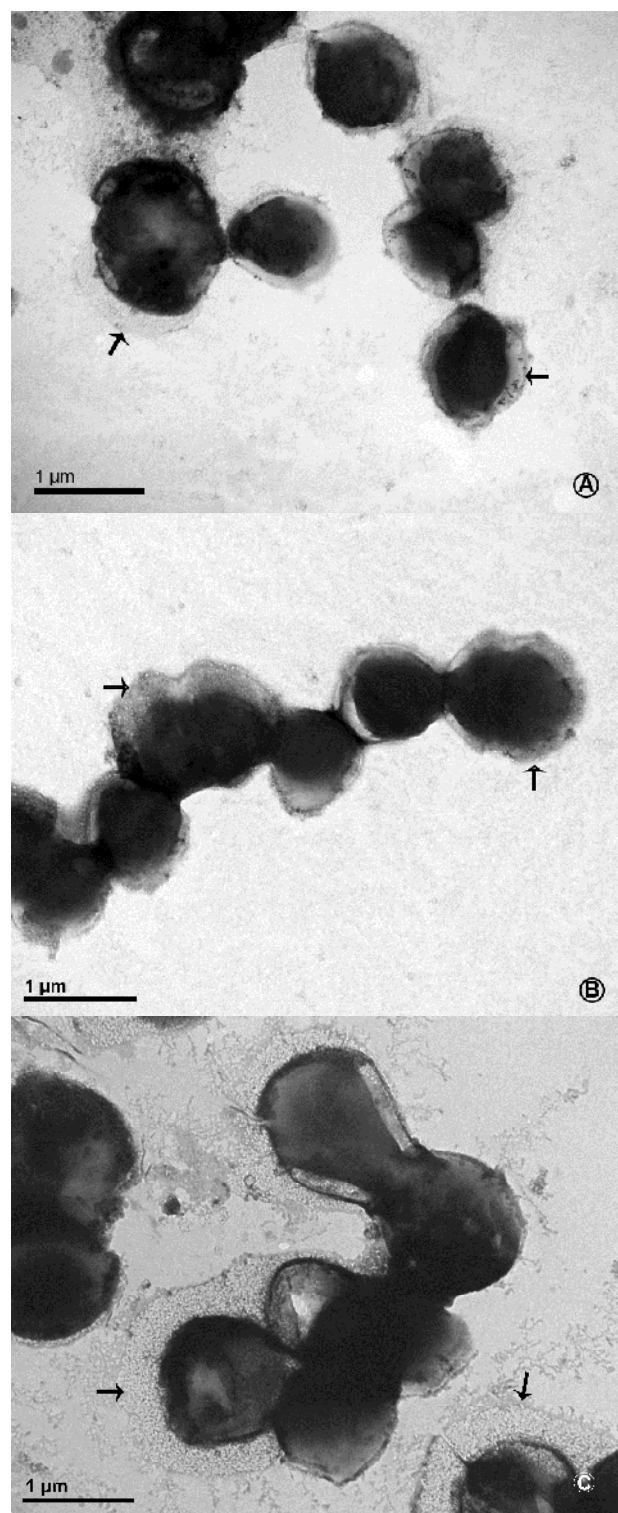
El estudio de los primoaislamientos mediante MET, permitió observar en los estreptococos aislados,

estructuras compatibles con cápsula en las observaciones en fresco (Fig. 3) y estructuras compatibles con proteína M en los cortes ultrafinos (Fig. 4). Las estructuras compatibles con cápsula pudieron observarse en 21 de los 22 de los aislamientos de *S. canis* y *S. dysgalactiae* estudiados al MET en fresco (Tabla 1). En la misma tabla puede observarse que el grupo G2 muestra un mayor número de aislamientos. Los cortes ultrafinos de las 17 cepas de estreptococos  $\beta$  hemolíticos estudiadas al MET mostraron presencia de proteína M. El análisis estadístico de los datos morfométricos permitió observar que las medidas de las cápsulas de las cepas de *S. canis* y *S. dysgalactiae* fueron similares ( $218,95 \pm 21,56$  vs  $210,71 \pm 10,39$  nm.). Las cepas de *S. canis* provenientes de perras G2 mostraron cápsulas más gruesas que las del grupo de perras G1 ( $234 \pm 24,2$  vs  $151,23 \pm 28,93$  nm;  $P < 0,001$ ). Las cepas de *S. dysgalactiae* provenientes de perras G2, mostraron cápsulas de similares medidas a las observadas en las perras G1 ( $210 \pm 13,54$  vs  $211,66 \pm 19,67$  nm.).

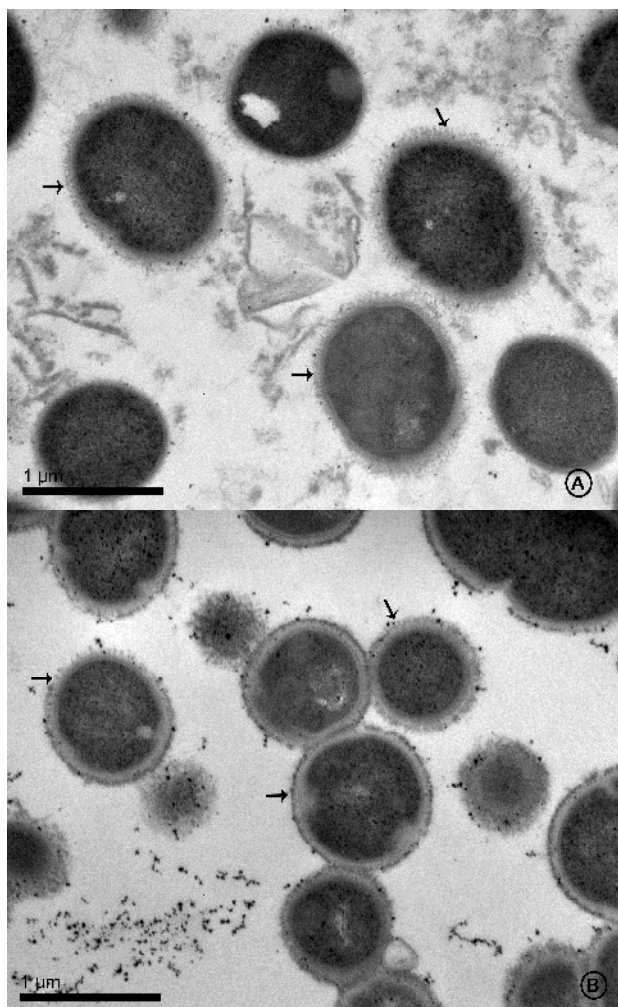
**Tabla 1.** Presencia de cápsula observada al MET mediante tinción negativa.

Grupo	<i>S. canis</i>	PC	AC	<i>S. dysgalactiae</i>	PC	AC
G1:	4	3	1	3	3	0
G2	10	10	0	4	4	0

G1: perras sin antecedentes de muertes neonatales, G2: perras con antecedentes de muertes neonatales, PC: presencia de cápsula, AC: ausencia de cápsula.



**Fig. 3.** Estructura bacteriana compatible con cápsula (flechas). A: *S. dysgalactiae*. B: *S. canis* (G1). C: *S. canis* (G2).



**Fig. 4.** Estructura bacteriana compatible con proteína M (flechas). **A:** *S. dysgalactiae*. **B:** *S. canis*.

Los estreptococos aislados e identificados fenotípicamente como *S. canis* en los grupos G1 y G2, se pudieron confirmar con la PCR utilizada en este trabajo y desarrollada por Hassan y col. [17], quienes identificaron a este microorganismo mediante la amplificación del gen *cfg* que codifica para el factor CAMP con la misma secuencia de cebadores que la utilizada por nosotros.

La identificación de *S. canis* aislado de vaginas de perras en nuestro trabajo coincide con hallazgos previos de este microorganismo en descargas vaginales de perras, los cuales fueron corroborados mediante la técnica de PCR por otros autores [21].

Los *S. dysgalactiae* identificados en este estudio por pruebas bioquímicas y serológicas, fueron corroborados por la técnica de PCR, con la amplificación del gen 23S del ADNr. Se usó esta secuencia de oligonucleótidos debido a que es común para las dos subespecies de *S. dysgalactiae* [22]. Kawata y col., identificaron a *S. dysgalactiae* aislados de cerdos usando este gen y comprobaron que existe un alto nivel de relación del ADN (85% a 88%) entre las dos subespecies (Kawata y col., 2003 [22]. A diferencia del cebador usado en nuestro trabajo (23S del ADNr), otros estudios utilizaron el gen 16S del ARNr para identificar subespecies de *S. dysgalactiae* [23,24]. El método de PCR presentado en este estudio permitió una identificación rápida y confiable de las especies de estreptococos estudiadas.

Los estudios ultramicroscópicos de los aislamientos de los estreptococos  $\beta$  hemolíticos, permitieron visualizar estructuras compatibles con proteína M en todos los cortes ultrafinos estudiados, mientras que la cápsula pudo observarse en la mayoría de las observaciones en fresco pero no en todas ya que una cepa no presentó estructura capsular. Nuestros hallazgos coinciden con la presencia de proteína M previamente descrita en *S. canis* y *S. dysgalactiae* [7, 8, 25]. Si bien se han realizado comunicaciones previas de presencia de cápsula en *S. dysgalactiae* [7], según nuestro conocimiento no existen comunicaciones previas de estructuras compatibles con cápsula en *S. canis*. Debido a que la cápsula puede perderse a través de sucesivos repiques [26] y que no todas las técnicas para observación bacteriana al MET son adecuadas para visualizar cápsula [27], hemos seleccionado para este trabajo el estudio de bacterias de primoaislamiento mediante observación en fresco con tinción negativa. Los hechos mencionados en el párrafo anterior podrían ser responsables de la no observación de cápsula del *S. canis* ocurrida en algunos trabajos [8], en los cuales no se utilizaron primoaislamientos y se

emplearon técnicas diferentes a la utilizada en nuestro trabajo para el estudio ultramicroscópico. Así mismo, otros autores han observado la cápsula en algunas especies de estreptococos (*S. equi* y *S. pyogenes*) mediante la observación en fresco utilizando tinción negativa [28,29].

La estructura capsular observada por nosotros es una estructura electrolucida, más gruesa que la observada en *S. equi* [28, 29], pero más delgada que la observada en *S. pyogenes* [28]. La comparación estadística de las mediciones cápsulares permitió observar diferencias en el grosor de la cápsula de cepas de *S. canis* entre los dos grupos (G1 y G2). Este hecho no fue observado en el grosor de la cápsula de *S. dysgalactiae*. Se ha comunicado que el grosor de la cápsula de *S. gallolyticus* se relaciona con la virulencia de la cepa estudiada, siendo las cepas más virulentas las que poseen cápsulas más gruesas [30]. Las cápsulas de *S. canis* observadas en el grupo G2 en nuestro trabajo fueron más gruesas que las del G1. Este hecho podrían relacionarse con la mayor virulencia de estas cepas y la ocurrencia de enfermedad y muerte neonatal observada en G2. A diferencia de lo observado en *S. canis*, las cepas de *S. dysgalactiae* aisladas en G1 y G2 mostraron un grosor capsular similar. Son conocidos diversos factores de patogenicidad de *S. dysgalactiae*, entre ellos podemos citar a la proteína M, la estreptoquinasa, pirógeno exotoxina C (speC), estreptolisina O o S, estreptodornasa (DNasa), exotoxina pirogénica G, hialuronidasa y cápsula [6, 7]. Tal vez en nuestro trabajo las cepas de los grupos G1 y G2 de *S. dysgalactiae* se diferencien no en el grosor de la cápsula sino en otros factores de virulencia. La proteína M y la cápsula observada en los estreptococos estudiados podrían ser algunos de los factores de virulencia implicados en la patogenicidad de *S. canis* y *S. dysgalactiae*. En este trabajo, las cepas estudiadas mediante ultramicroscopía fueron obtenidas al final de la

gestación del tracto genital de perras con antecedentes de muertes neonatales y perras que parían camadas normales. Es bien conocida en humanos la infección neonatal con estreptococo  $\beta$  hemolítico que ocurre durante el parto cuando el feto atraviesa la vagina materna. Este hecho produce sepsis y muerte neonatal (Schuchat, 1998; Winn, 2007; de Paris, 2011 [32, 33, 34]. Nuestros hallazgos podrían relacionarse con el rol de los estreptococos en la enfermedad neonatal canina. Los neonatos caninos se infectarían al pasar por el canal del parto o al estar en contacto con las descargas vulvares de la madre y las cepas más virulentas de *S. canis* y *S. dysgalactiae* colonizarían al neonato produciendo sepsis y muerte neonatal tal como ocurre en humanos.

El aislamiento de estreptococo  $\beta$  hemolítico de la vagina de las perras muestreadas (G1 y G2), indica que el microorganismo está presente en ambos grupos de perras.

Los aislamientos de estreptococos  $\beta$  hemolíticos encontrados en las perras con antecedentes, superan a los encontrados en las perras sin antecedentes de muertes neonatales. Este hecho podría relacionarse con la transmisión de la bacteria al neonato durante el parto al pasar por la vagina tal como ocurre en humanos [31,32, 33]. Sin embargo, los aislamientos de estreptococos  $\beta$  hemolíticos en hembras caninas sin antecedentes podrían indicar que aunque la bacteria esté presente no siempre ocurre la transmisión al neonato. Este hecho estaría sustentado por lo ocurrido en humanos, donde la transmisión vertical del microorganismo desde la madre colonizada al recién nacido, ocurre en el 75% de los casos y no todos los neonatos nacidos de madres con colonización vaginal de estreptococo  $\beta$  hemolítico desarrollan la enfermedad [32, 33].

## AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se contó con la colaboración de la Técnica Biológica Roxana Peralta del

Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

## REFERENCIAS

- [1] Biberstein EL, Hirsh DC: (1999). *Streptococci*. In: *Veterinary Microbiology*, ed. Hirsh DC, Zee YC, pp. 120–126. Blackwell Science, Malden, MA.
- [2] Findik M., Maral N., Keskin O., Kalender H., Erdeger J., Aslan S. (2003). “The relationship between the stages of the sexual cycle, the pregnancy and postpartum periods and vaginal flora in kangal breed bitches”. *Turk J Vet Anim Sci.* Vol. 27. p. 761–765.
- [3] Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. (2012) “Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility”. *Theriogenology*. 77(8):1549-56.
- [4] Greene, C. E., and J. F. Prescott. (2012). Streptococcal and other Grampositive bacterial infections, In *Infectious diseases of the dog and cat*, ed C. E. Greene, 4th ed, pp. 325–340 W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.
- [5] Vela A I, Falsen E, Simarro I, Rollan E, Collins M D, Domínguez L, Fernandez-Garayzabal DJ. (2006) “Neonatal Mortality in Puppies Due to Bacteremia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Dysgalactiae*”. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (2) p. 666–668.
- [6] Timoney JF. (2010) *Streptococcus*. In *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. ed Giles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, ed. 4th. pp. 51-74 Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- [7] Brandt CM, Spellerberg B. (2009). “Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*”. *Clin Infect Dis*. 49(5):766-72.
- [8] De Winter LM, Low DE, Prescott JF. (1999) “Virulence of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis”. *Vet Microbiol*. 70(1-2):95-110.
- [9] Roth A, Reichmann P, Hakenbeck R. (2012) “The capsule of *Streptococcus pneumoniae* contributes to virulence in the insect model *Manduca sexta*”. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 22(5):326-34.
- [10] Schragar HM, Alberti S, Cywes C, Dougherty GJ, Wessels MR (1998) “Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A streptococcus to CD44 on human keratinocytes”. *J Clin Invest* 101: 1708–1716.
- [11] Stornelli MC, García Mitacek MC, Giménez F, Bonaura MC, Videla Dorna I; de la Sota RL, Stornelli MA. (2012). Pharmacokinetics of eCG and induction of fertile estrus in bitches using eCG followed by hCG. *Theriogenology*. 78: 1056–1064.
- [12] Stornelli, M.A.; Cerda, R.; Arauz, M.S.; Gobello, M.C.; Stanchi, N.O. (2000). Estudio de Mycoplasmas y Bacterias Aerobicas en la vagina craneal de hembras caninas clínicamente sanas. *Analecta Veterinaria*. 20 (1): 40-42.
- [13] Schäfer-Somi S, Spargser J, Breitenfellner J, Aurich JE. (2003) “Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies--a retrospective study”. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 50(7):343-6.



- [14] Winn W., Allen S., Janda W., Koneman A., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. (2006) Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6ta ed, Lippincott Williams & Wilkin, USA, 2006, p. 652-676.
- [15] Lancefield, R. C. (1933) "A serological differentiation of human and other groups of streptococci". *J. Exp. Med.* 59:441-158.
- [16] Daly JA, Seskin KC. (1988). "Evaluation of rapid, commercial latex techniques for serogrouping beta-hemolytic streptococci". *J Clin Microbiol.* 26(11):2429-31.
- [17] Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lämmler C. (2003) "Development of PCR assays for detection of *Streptococcus canis*". *FEMS Microbiol Lett.* 219(2):209-14.
- [18] Kawata K, Anzai T, Senna K, Kikuchi N, Ezawa A, Takahashi T. (2004) "Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence". *FEMS Microbiol Lett.* 237(1):57-64.
- [19] SAS Institute Inc, SAS/C Compiler and Library User's Guide, Release 6,00, (4th edition), (1996) Cary, NC: SAS Institute Inc., 433 pp.
- [20] National Research Council. (2002) Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2da. Edición. México. Ed Lomelí, C. Estampa de artes gráficas.
- [21] Pinho MD, Matos SC, Pomba C, Lübke-Becker A, Wieler LH, Preziuso S, Melo-Cristino J, Ramirez M. Multilocus sequence analysis of *Streptococcus canis* confirms the zoonotic origin of human infections and reveals genetic exchange with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(4):1099-109.
- [22] Kawata K, Minakami T, Mori Y, Katsumi M, Kataoka Y, Ezawa A, Kikuchi N, Takahashi T. rDNA sequence analyses of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53(Pt 6):1941-6.
- [23] Woo PC, Fung AM, Lau SK, Wong SS, Yuen KY. Group G beta-hemolytic streptococcal bacteremia characterized by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9):3147-55.
- [24] Preziuso S, Pinho MD2, Attili AR, Melo-Cristino J, Acke E, Midwinter AC, Cuteri V, Ramirez M. PCR based differentiation between *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains isolated from humans and horses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014; 37(3):169-72.
- [25] Vasi J, Frykberg L, Carlsson LE, Lindberg M, Guss. (2000) "B.M-like proteins of *Streptococcus dysgalactiae*". *Infect Immun.* 68(1):294-302.
- [26] Barreto G y Rodríguez H. (2007) "La cápsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial". *Rev. prod. Anim.* 20 (1): 69-80.
- [27] Stukalov O, Korenevsky A, Beveridge TJ, Dutcher JR. (2008) "Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative

- studies of bacterial capsules”. *Appl Environ Microbiol.* 74(17):5457-65.
- [28] Fazio M and Fischetti VA. (2004) “Streptococcus pyogenes -transmission electron micrograph. with permission”. *The Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Immunology, Rockefeller University. New York. [Online]* <http://www.rockefeller.edu/vaf/capsule.php>
- [29] Bustos C P, Muñoz AJ, Guida N. (2015) “ Expresión de la cápsula en aislamientos de Streptococcus equi subsp. Equi”. *Rev Argent Microbiol.* 47(4):380---381.
- [30] Vanrobaeys M, De Herdt P, Charlier G, Ducatelle R, Haesebrouck F. (1999) “Ultrastructure of surface components of Streptococcus gallolyticus (S. bovis) strains of differing virulence isolated from pigeons”. *Microbiology.* 145 (Pt 2):335-42.
- [31] Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:497-513.
- [32] Winn HN. Group B streptococcus infection in pregnancy. *Clin Perinatol.* 2007; 34(3):387-92.
- [33] de-Paris F, Machado AB, Gheno TC, Ascoli BM, Oliveira KR, Barth AL. Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(4):323-7.